



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets ⁶ : C12N 1/00		A2	(11) Numéro de publication internationale: WO 99/20739 (43) Date de publication internationale: 29 avril 1999 (29.04.99)
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/EP98/06636</p> <p>(22) Date de dépôt international: 9 octobre 1998 (09.10.98)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 97203245.2 17 octobre 1997 (17.10.97) EP</p> <p>(71) Déposant (<i>pour tous les Etats désignés sauf US</i>): SOCIETE DES PRODUITS NESTLE S.A. [CH/CH]; Case postale 353, CH-1800 Vevey (CH).</p> <p>(72) Inventeurs; et</p> <p>(75) Inventeurs/Déposants (<i>US seulement</i>): GAIER, Walter [DE/FR]; Le Gascoin, Fournerville, F-14600 Honfleur (FR). PRIDMORE, David [GB/CH]; 126, route du Jorat, Vers-chez-les-Blancs, CH-1000 Lausanne 26 (CH). STINGELLE, Francesca [DE/CH]; 10, route du Signal, CH-1018 Lausanne (CH). NEESER, Jean-Richard [CH/CH]; 6, sentier de Courtaraye, CH-1073 Savigny (CH). DESACHY, Patrice [CH/CH]; 2C, chemin du Fau-Blanc, CH-1009 Pully (CH). POT, Bruno [BE/BE]; Ter Beke 23, B-8200 Sint-Michiels Brugge (BE).</p> <p>(74) Mandataire: VUILLE, Roman, L.; 55, avenue Nestlé, CH-1800 Vevey (CH).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, ID, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, SG, TR, US, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Publiée <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i></p>	
<p>(54) Title: NOVEL LACTIC ACID BACTERIA SPECIES</p> <p>(54) Titre: NOUVELLE ESPECE DE BACTERIE LACTIQUE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a lactic acid bacteria strain (1), whereof the RNA ribosome 16S is characteristic of the genus <i>Streptococcus</i> (2), whose profile in crude proteins, obtained after migration of crude proteins on SDS-PAGE gel electrophoresis, is characteristic of that of the CNCM I-1926 lactic acid bacteria strain, but distinct from those of species recognised as belonging to the genus <i>Streptococcus</i>, namely <i>S. acidominimus</i>, <i>S. agalactiae</i>, <i>S. alactolyticus</i>, <i>S. anginosus</i>, <i>S. bovis</i>, <i>S. canis</i>, <i>S. caprinus</i>, <i>S. constellatus</i>, <i>S. cricetus</i>, <i>S. cristatus</i>, <i>S. difficile</i>, <i>S. downei</i>, <i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>dysgalactiae</i>, <i>S. dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i>, <i>S. equi</i>, <i>S. equi</i> ssp. <i>equi</i>, <i>S. equi</i> ssp. <i>zooepidemicus</i>, <i>S. equinus</i>, <i>S. ferus</i>, <i>S. gallolyticus</i>, <i>S. gordonii</i>, <i>S. hyoilectinalis</i>, <i>S. hyovaginalis</i>, <i>S. iniae</i>, <i>S. intermedius</i>, <i>S. intestinalis</i>, <i>S. macacae</i>, <i>S. mitis</i>, <i>S. mutans</i>, <i>S. oralis</i>, <i>S. parasanguinis</i>, <i>S. parauensis</i>, <i>S. phocae</i>, <i>S. pleomorphus</i>, <i>S. pneumoniae</i>, <i>S. porcinus</i>, <i>S. pyogenes</i>, <i>S. ratti</i>, <i>S. salivarius</i>, <i>S. sanguinis</i>, <i>S. shiroi</i>, <i>S. suis</i>, <i>S. thermophilus</i>, <i>S. thoraltensis</i>, <i>S. uberis</i>, <i>S. vestibularis</i>, <i>S. viridans</i>. The invention also concerns the use of said lactic acid bacteria strain, or a polysaccharide secreted by said strain, for preparing a food composition, in particular a lactic milk or fresh cheese. The invention further concerns a food or pharmaceutical composition comprising a lactic acid bacteria or a polysaccharide constituted by a chain of glucose, galactose and N-acetylglucosamine in a ratio of 3:2:1 respectively.</p>			

(57) Abrégé

Souche de bactérie lactique, (1) dont l'ARN ribosomique 16S est caractéristique du genre *Streptococcus*, (2) dont le profil en protéines totales, obtenu après migration des protéines totales sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE, est caractéristique de celui de la souche de bactérie lactique CNCM I-1926, mais distinct de ceux des espèces reconnues appartenant au genre *Streptococcus*, à savoir *S. acidominimus*, *S. agalactiae*, *S. alactolyticus*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. caprinus*, *S. constellatus*, *S. cricetus*, *S. cristatus*, *S. difficile*, *S. downei*, *S. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *S. equi*, *S. equi* ssp. *equi*, *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, *S. equinus*, *S. ferus*, *S. gallolyticus*, *S. gordonii*, *S. hyointestinalis*, *S. hyovaginalis*, *S. iniae*, *S. intermedius*, *S. intestinalis*, *S. macacae*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. parauberis*, *S. phocae*, *S. pleomorphus*, *S. pneumoniae*, *S. porcinus*, *S. pyogenes*, *S. ratti*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. shiroi*, *S. sobrinus*, *S. suis*, *S. thermophilus*, *S. thoraltensis*, *S. uberis*, *S. vestibularis*, *S. viridans*. L'invention concerne aussi l'utilisation d'une souche de bactérie lactique selon l'invention, ou d'un polysaccharide sécrété par une souche selon l'invention, pour la préparation d'une composition alimentaire, notamment d'un lait acidifié ou d'un fromage frais. L'invention concerne aussi une composition alimentaire ou pharmaceutique comprenant une souche de bactérie lactique ou un polysaccharide constitué par un enchaînement de glucose, galactose et N-acétylglucosamine dans une proportion respective de 3:2:1.

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publient des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lithuanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakhstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

Nouvelle espèce de bactérie lactique

La présente invention a trait à une nouvelle espèce de bactérie lactique appartenant au genre *Streptococcus*.

5

Etat de la technique

L'identification des bactéries lactiques est essentielle dans l'industrie laitière, et consiste à différencier entre plusieurs espèces des caractéristiques distinctives 10 d'ordre morphologique, physiologique et/ou génétique.

Les caractères physiologiques distinctifs pour une espèce donnée de bactérie lactique peuvent être obtenus au moyen de différents tests incluant, par exemple, l'analyse de la capacité à fermenter différents sucres et l'analyse standardisée du 15 profil de migration des protéines totales sur un gel d'électrophorèse du type SDS-PAGE (Pot *et al.*, *Taxonomy of lactic acid bacteria, In Bacteriocins of lactic acid bacteria, Microbiology, Genetics and Applications*, L. De Vuyst, and E. J. Vandamme ed., Blackie Academic & Professional, London, 1994).

20 Le profil de migration des protéines totales d'une espèce donnée, obtenu sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, lorsqu'il est comparé à l'aide d'un densimètre à d'autres profils provenant d'autres espèces, permet de déterminer les relations taxonomiques entre les espèces. L'analyse numérique des différents profils, par exemple avec le logiciel GelCompar® permet notamment d'établir un degré de 25 corrélation entre les espèces qui est fonction de différents paramètres, en particulier des algorithmes utilisés (GelCompar, version 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgique; algorithmes: "Pearson Product Moment Correlation Coefficient, Unweighted pair Group Method using Average Linkage").

30 A ce jour, l'analyse comparative du profil des protéines totales par électrophorèse sur gel SDS-PAGE a fait ses preuves comme un moyen efficace pour distinguer des groupes homogènes et distincts d'espèces de bactéries lactiques (Pot *et al.*, *Chemical Methods in Prokaryotic Systematics*, Chapitre 14, M. Goodfellow A.G. O'Donnell Ed., John Wiley and Sons Ltd, 1994).

35

Avec cette méthode SDS-PAGE, les expériences précédentes ont ainsi montré que lorsque l'on obtient un degré de corrélation de Pearson de plus de 78 (sur une échelle de 100) entre deux souches de bactéries lactiques, on peut valablement en déduire que celles-ci appartiennent à la même espèce (Kersters *et al.*, Classification and Identification methods for lactic bacteria with emphasis on protein gel electrophoresis, *In Acid Lactic Bacteria, Actes du Colloque Lactic'91*, 33-40, Adria Normandie, France, 1992; Pot *et al.*, The potential role of a culture collection for identification and maintenance of lactic acid bacteria, Chapter 15, pp. 81-87, *In: The Lactic Acid Bacteria*, E. L. Foo, H. G. Griffin, R. Mollby, and C. G. Heden, Proceedings of the first lactic computer conference, Horizon Scientific Press, Norfolk).

A titre d'exemple, le groupe des bactéries lactiques acidophiles a pu être récemment divisé en 6 espèces distinctes au moyen de cette technique (Pot *et al.*, J. General Microb., 139, 513-517, 1993). De même, cette technique a pu récemment établir, en combinaison avec d'autres techniques, l'existence de plusieurs nouvelles espèces de *Streptococcus*, comme *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, *Streptococcus hyovaginalis* sp. nov. et *Streptococcus thoraltensis* sp. nov (Vandamme *et al.*, Int. J. Syst Bacteriol., 46, 774-781, 1996; Devriese *et al.*, Int. J. Syst Bacteriol., 1997, In press).

L'identification de nouvelles espèces de bactéries lactiques ne peut cependant se réduire à une analyse purement morphologique et/ou physiologique des bactéries. En effet, deux espèces très proches morphologiquement et/ou physiologiquement peuvent être éloignées d'un point de vue génétique. L'analyse de l'ARN ribosomique 16S des bactéries lactiques revêt ainsi une importance capitale pour déterminer définitivement l'appartenance d'une bactérie lactique à un genre ou une espèce déjà connue.

A ce jour, la "Deutsche Sammlung Von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH" (DSM, Braunschweig, Allemagne) a officiellement recensé environ 48 espèces différentes appartenant au genre *Streptococcus* (voir la liste ci-après). Toutes ces espèces possèdent un ARN ribosomique 16S qui est typique du genre *Streptococcus*, et peuvent être réparties dans des groupes distincts et homogènes, au moyen de la technique SDS-PAGE mentionnée ci-dessus.

La présente invention a trait à l'identification, au moyen des techniques d'identifications avancées ci-dessus, d'une nouvelle espèce de bactérie lactique appartenant au genre *Streptococcus*, et à son utilisation dans l'industrie laitière en général.

Résumé de l'invention

A cet effet, l'invention concerne toute bactérie lactique,

- dont l'ARN ribosomique 16S est caractéristique du genre *Streptococcus*,
- dont le profil en protéines totales, obtenu après migration des protéines totales sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE, est caractéristique de celui de la souche de bactérie lactique CNCM I-1920, mais distinct de ceux des espèces reconnues appartenant au genre *Streptococcus*, à savoir *S. acidominimus*, *S. agalactiae*, *S. alactolyticus*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. caprinus*, *S. constellatus*, *S. cricetus*, *S. cristatus*, *S. difficile*, *S. downei*, *S. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *S. equi*, *S. equi* ssp. *equi*, *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, *S. equinus*, *S. ferus*, *S. gallolyticus*, *S. gordonii*, *S. hyointestinalis*, *S. hyovaginalis*, *S. iniae*, *S. intermedius*, *S. intestinalis*, *S. macacae*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. parauberis*, *S. phocae*, *S. pleomorphus*, *S. pneumoniae*, *S. porcinus*, *S. pyogenes*, *S. ratti*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. shiloi*, *S. sobrinus*, *S. suis*, *S. thermophilus*, *S. thoraltensis*, *S. uberis*, *S. vestibularis*, *S. viridans*.

L'invention concerne l'utilisation d'une souche de bactérie lactique selon l'invention pour la préparation d'une composition alimentaire, notamment un lait acidifié ou un fromage frais, par exemple.

L'invention concerne également l'utilisation d'un polysaccharide, susceptible d'être sécrété par une bactérie lactique selon l'invention, qui est constitué par un enchaînement de glucose, galactose et N-acétylglucosamine dans une proportion respective de 3:2:1 pour la préparation d'une composition alimentaire ou pharmaceutique.

L'invention a pour objet une composition alimentaire ou pharmaceutique comprenant une souche de bactérie lactique selon l'invention.

Enfin, l'invention a aussi pour objet une composition alimentaire ou pharmaceutique comprenant un polysaccharide constitué par un enchaînement de glucose, galactose et N-acétylglucosamine dans une proportion respective de 5 3:2:1.

Description détaillée de l'invention

L'appartenance de la nouvelle espèce selon l'invention au genre *Streptococcus* est 10 de préférence mise en évidence en comparant la séquence nucléotidique de l'ARN ribosomique 16S des bactéries selon l'invention, ou de leur ADN génomique qui est transcrit en ARN ribosomique 16S, à celles des autres genres et espèces de bactéries lactiques connues à ce jour.

15 Plus particulièrement, on peut mettre en œuvre la méthode exposée dans l'exemple 1 ci-après, ou encore d'autres méthodes connues par l'hommé du métier (Schleifer et al., System. Appl. Microb., 18, 461-467, 1995; Ludwig et al., System. Appl. Microb., 15, 487-501, 1992), par exemple. La séquence nucléotidique SEQ ID NO:1 présentée dans la liste de séquence ci-après est caractéristique de cette 20 nouvelle espèce, et présente des similitudes frappantes avec les séquences d'ARN ribosomique 16S trouvées dans les espèces de *Streptococcus* reconnues à ce jour.

La nouvelle espèce selon l'invention, qui constitue un nouveau groupe distinct et 25 homogène, peut être aussi différenciée des autres espèces connues appartenant au genre *Streptococcus* au moyen de la technique d'identification des protéines totales sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE décrite plus haut.

En particulier, cette nouvelle espèce peut donner un profil en protéines totales, obtenu après culture de la bactérie dans un milieu MRS pendant 24 h à 28°C, 30 extraction des protéines totales et migration des protéines sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, qui présente un degré de corrélation de Pearson d'au moins 78 (sur une échelle de 100) avec le profil obtenu dans des conditions identiques avec la souche de bactérie lactique CNCM I-1920, et cela au regard des 35 profils obtenus dans des conditions identiques avec quelques-unes des différentes espèces de bactéries lactiques, notamment celles indiquées ci-après, par exemple.

- Plus particulièrement, cette technique consiste à (1) isoler toutes les protéines (=protéines totales) d'une culture de bactérie lactique cultivée dans des conditions définies, (2) séparer les protéines par électrophorèse sur gel SDS-PAGE, (3) analyser la disposition des différentes fractions de protéines séparées à l'aide d'un densimètre qui mesure l'intensité et l'emplacement de chaque bande, (4) et à comparer le profil de protéines ainsi obtenu à ceux de plusieurs autres espèces de *Streptococcus* qui ont été, en parallèle ou au préalable, obtenus exactement dans les mêmes conditions opératoires.
- Les techniques de préparation d'un profil de protéines totales telles que décrites ci-dessus, ainsi que l'analyse numérique de tels profils, sont bien connues par l'homme du métier. Néanmoins, les résultats ne sont fiables que dans la mesure où chaque étape du procédé est suffisamment standardisée. Face à ce besoin, des procédures standardisées sont ainsi régulièrement mises à la disposition du public par leurs auteurs. On peut citer notamment celle de Pot *et al.* présentée au cours d'un "workshop" organisé pas l'Union Européenne, à l'université de Ghent, en Belgique, le 12 au 16 septembre 1994 (*Fingerprinting techniques for classification and identification of bacteria, SDS-PAGE of whole cell protein*).
- Le logiciel utilisé dans la technique d'identification sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE revêt une importance déterminante dans la mesure où le degré de corrélation entre les espèces dépend des paramètres et des algorithmes utilisés par ce logiciel. Sans vouloir rentrer dans les détails théoriques, la comparaison quantitative de bandes captées par un densimètre et normalisées par un calculateur est faite de préférence avec le coefficient de corrélation de Pearson. La matrice de similitude ainsi obtenue peut être organisée à l'aide de l'algorithme UPGMA (unweighted pair group method using average linkage), un algorithme qui permet non seulement de regrouper les profils les plus similaires, mais aussi de construire des dendogrammes (voir Kersters K., *Numerical methods in the classification and identification of bacteria by electrophoresis*, In Computer-assisted Bacterial Systematics, 337-368, M. Goodfellow A.G. O'Donnell Ed., John Wiley and Sons Ltd, 1985).
- De préférence, les souches de la nouvelle espèce présentent un profil en protéines totales ayant un degré de corrélation de Pearson d'au moins 85 au regard d'une des

souches de bactéries de la nouvelle espèce. Pour les biotypes mentionnés ci-dessous, ce degré de corrélation de Pearson peut même dépasser 90, par exemple.

Au moyen de cette technique d'identification sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE, 5 la nouvelle espèce appartenant au genre *Streptococcus* selon l'invention peut se distinguer de toutes les espèces de *Streptococcus* reconnues à ce jour, à savoir les espèces *S. acidominimus*, *S. agalactiae*, *S. alactolyticus*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. caprinus*, *S. constellatus*, *S. cricetus*, *S. cristatus*, *S. difficile*, *S. downei*, *S. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *S. equi*, *S. equi* 10 ssp. *equi*, *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, *S. equinus*, *S. ferus*, *S. gallolyticus*, *S. gordonii*, *S. hyointestinalis*, *S. hyovaginalis*, *S. iniae*, *S. intermedius*, *S. intestinalis*, *S. macacae*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. parauberis*, *S. phocae*, *S. pleomorphus*, *S. pneumoniae*, *S. porcinus*, *S. pyogenes*, *S. ratti*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. shiloi*, *S. sobrinus*, *S. suis*, *S. thermophilus*, *S. thoraltensis*, *S. uberis*, *S. vestibularis*, *S. viridans*. 15

La nouvelle espèce selon l'invention se distingue également par cette technique des bactéries lactiques qui avaient été précédemment classées par erreur dans le 20 genre des *Streptococcus* comme *S. adjacens* (nouvelle classification = *Abiotrophia adiacens*), *S. casseliflavus* (= *Enterococcus casseliflavus*), *S. cecorum* (= *Enterococcus cecorum*), *S. cremoris* (= *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), *S. defectivus* (= *Abiotrophia defectiva*), *S. faecalis* (= *Enterococcus faecalis*), *S. faecium* (= *Enterococcus faecium*), *S. gallinarum* (= *Enterococcus gallinarum*), *S. garvieae* (= *Lactococcus garvieae*), *S. hansenii* (= *Ruminococcus hansenii*), *S. lactis* (= *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), *S. lactis* *cremoris* (= *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*), *S. lactis* *diacetilactis* (= *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*), *S. morbillorum* (= *Gemella morbillorum*), *S. parvulus* (= *Atopobium parvulum*), *S. plantarum* (= *Lactococcus plantarum*), *S. raffinolactis* (= *Lactococcus raffinolactis*) et *S. saccharolyticus* (= *Enterococcus saccharolyticus*). 25

30 Les bactéries lactiques selon l'invention ont une morphologie caractéristique des *Lactococcus lactis*, par exemple, c'est à dire ont la forme de coques assemblés en chaînes.

35 Les sucres fermentescibles par la nouvelle espèce sont généralement au moins l'un des suivants, à savoir, le D-galactose, le D-glucose, le D-fructose, le D-mannose,

la N-acétyl-(D-)glucosamine, la salicine, le cellobiose, le maltose, le lactose, le saccharose et le raffinose.

5 Parmi toutes les souches de la nouvelle espèce qui ont été isolées dans des laiteries en Suisse, 7 ont été déposées sous le traité de Budapest, à titre d'exemple, à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), 25 rue du docteur Roux, 75724 Paris, le 14 octobre 1997, où elles se sont vues attribuer les numéros de dépôt CNCM I-1920, I-1921, I-1922, I-1923, I-1924, I-1925 et I-1926.

10 Les souches de la nouvelle espèce peuvent être utilisées pour préparer un produit alimentaire ou pharmaceutique, notamment sous forme d'une culture fraîche, concentrée ou séchée, par exemple.

15 Les produits à base de lait sont bien évidemment préférés dans le cadre de l'invention. Par lait, on entend cependant désigner, d'une part, un lait d'origine animale, tel que les laits de vache, de chèvre, de brebis, de buflesse, de zébue, de jument, d'ânesse, de chamelle, etc. Ce lait peut être un lait à l'état natif, un lait reconstitué, un lait écrémé, ou un lait additionné de composés nécessaires à la croissance des bactéries ou au traitement subséquent du lait fermenté, comme des 20 matières grasses, de protéines d'un extrait de levure, de la peptone et/ou un surfactant, par exemple. Le terme lait s'applique également à ce que l'on appelle communément un lait végétal, c'est à dire un extrait de matières végétales traitées ou non, telles que les légumineuses (soja, pois chiche, lentille, ect...) ou des oléagineuses (colza, soja, sésame, coton, ect...), extrait qui contient des protéines 25 en solution ou en suspension colloïdale, coagulables par action chimique, par fermentation acide et/ou par la chaleur. Enfin, le mot lait désigne aussi des mélanges de laits animaux et de laits végétaux.

30 Les produits pharmaceutiques peuvent être toutes sortes de produits destinés à être administrés oralement, voire même d'une manière topique, qui comprennent un support pharmaceutique acceptable sur, ou dans lequel, on adjoint une culture de la nouvelle espèce sous forme fraîche, concentrée ou séchée, par exemple. Ces 35 produits pharmaceutiques peuvent se présenter sous forme d'une suspension ingestible, d'un gel, d'un diffuseur, d'une capsule, d'une gélule, d'un sirop, ou sous n'importe quelle autre forme galénique connue par l'homme du métier.

Par ailleurs, certaines souches de la nouvelle espèce selon l'invention, représentant un nouveau biotype de cette espèce, peuvent aussi présenter la propriété remarquable d'être à la fois mésophile et thermophile (biotype mésophile/thermophile). Les souches appartenant à ce biotype présentent en effet 5 un optimum de croissance dès environ 28°C jusqu'environ 45°C. Cette propriété peut être facilement observée (1) en préparant plusieurs cultures d'un biotype mésophile/thermophile, en parallèle, à des températures s'échelonnant de 20 à 10 50°C, (2) en mesurant les absorbances des milieux après 16h de culture, par exemple, et (3) en réunissant les résultats sous forme d'un graphique représentant l'absorbance en fonction de la température (graditherme). La figure 1 est particulièrement représentative des graphiques que l'on peut obtenir avec ce biotype mésophile/thermophile selon l'invention. A titre d'indication, parmi les 15 souches de la nouvelles espèces présentant ce biotype particulier, les souches CNCM I-1920, I-1921 et I-1922 sont particulièrement représentatives, par exemple.

L'utilisation d'un biotype mésophile/thermophile dans l'industrie laitière revêt une 20 importance non négligeable. En effet, on peut utiliser cette espèce pour la préparation de starters mésophiles ou thermophiles. On peut ainsi produire industriellement des lait acidifiés à 45°C pour obtenir un produit du type "yoghourt". On peut aussi produire industriellement des fromages frais en fermentant un lait en présence de présure à 28°C, et en séparant le caillé ainsi formé par centrifugation ou ultrafiltration. Les problèmes d'encrassement des 25 machines liés à l'utilisation de ferments thermophiles sont ainsi éliminés (ces problèmes sont exposés dans la demande de brevet EP N°96203683.6)

Par ailleurs, d'autres souches de la nouvelle espèce selon l'invention, représentant 30 un autre nouveau biotype de cette espèce, peuvent présenter la propriété remarquable de conférer une viscosité au milieu de fermentation (biotype texturant). Le caractère visqueux d'un lait fermenté par un biotype texturant selon l'invention peut être observé et déterminé comme décrit ci-après.

1. Par observation de la structure d'un lait acidifié par un biotype texturant en comparaison de celle du lait acidifié avec des cultures non-texturantes. Le lait non-visqueux adhère aux parois d'un gobelet en verre, tandis que le lait visqueux est cohérent sur lui-même.

2. Un autre essai peut être effectué à la pipette. La pipette est trempée dans le lait acidifié qui est aspiré en quantité d'environ 2 ml, puis la pipette est retirée du lait. Le lait visqueux forme un fil entre la pipette et la surface liquide, tandis que le lait non-visqueux ne donne pas lieu à ce phénomène. Lorsque le liquide est relâché de la pipette, le lait non-visqueux forme des gouttes distinctes tout comme l'eau, alors que le lait visqueux forme des gouttes se terminant par de longs fils qui aboutissent au bec de la pipette.

10

3. Lorsqu'un tube à essai rempli à peu près jusqu'au tiers de sa hauteur est agité à l'aide d'un agitateur rotatif, le lait non-visqueux remonte sur la face intérieure de la paroi, alors que l'ascension du lait visqueux est pratiquement nulle.

15

Le caractère visqueux de ce biotype particulier peut encore être déterminé à l'aide d'un paramètre rhéologique mesurant la viscosité. Quelques appareils commerciaux sont à même de déterminer ce paramètre, comme le rhéomètre Bohlin VOR (Bohlin GmbH, Allemagne). Conformément aux instructions du fournisseur, l'échantillon est placé entre un plateau et un cône tronqué de même diamètre (30 mm, angle de 5,4°; entrefer de 0,1 mm), puis l'échantillon est soumis à un gradient de vitesse de cisaillement rotatif continu qui le force à s'écouler. L'échantillon, en résistant contre la déformation, développe une force tangentielle appelée contrainte de cisaillement (shear stress). Cette contrainte qui est proportionnelle à la résistance à l'écoulement est mesurée par l'intermédiaire d'une barre de torsion. La viscosité de l'échantillon est alors déterminée, pour une vitesse de cisaillement donnée, par le rapport entre la contrainte de cisaillement (Pa) et la vitesse de cisaillement (s^{-1}) (voir aussi "Le Technoscope de Biofutur", Mai 97).

20

Les essais de mesure rhéologique du caractère texturant de ce biotype ont conduit à la définition suivante. Une bactérie lactique appartenant au biotype texturant selon l'invention est une bactérie qui, lorsqu'elle fermente un lait semi-écrémé à 38°C jusqu'à pH 5,2, donne une viscosité au milieu qui est supérieure à 100 mPa.s à une vitesse de cisaillement de l'ordre de 293 s^{-1} , par exemple. A titre

25

30

35

d'indication, les souches CNCM I-1922, I-1923, I-1924, I-1925 et I-1926 sont particulièrement représentatives de ce biotype texturant, par exemple.

Ce biotype texturant revêt également une importance non négligeable dans l'industrie laitière, car sa capacité à donner une viscosité à un produit laitier est exceptionnellement élevée lorsqu'on la compare avec celles d'autres espèces de bactéries lactiques texturantes, en particulier avec les souches *Lactobacillus helveticus* CNCM I-1449, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1351, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1879, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1590, *Lactobacillus bulgaricus* CNCM I-800 et *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* CNCM I-1692, dont il est fait mention respectivement dans les demandes de brevet EP699689, EP638642, EP97111379.0, EP750043, EP367918 et EP97201628.1.

On peut aussi remarquer que la production d'une viscosité peut s'effectuer, pour certaines souche, dans une gamme de température très large qui s'étend des températures mésophiles (25-30°C) aux températures termophiles (40-45°C). Cette particularité représente un avantage technologique évident.

Par ailleurs, certaines souches appartenant à ce nouveau biotype texturant produisent de surcroît un exopolysaccharide (EPS) de haut poids moléculaire; dont la composition en sucre est similaire à celle retrouvée dans les oligosaccharides du lait maternel humain. Cet EPS est en fait constitué par un enchaînement de glucose, galactose et N-acétylglucosamine dans une proportion de 3:2:1 respectivement (A. Kobata, *In the Glycoconjugates*, vol. 1, "Milk glycoproteins and oligosaccharides", p.423-440, Ed. I. Horowitz and W. Pigman, Ac. Press, N.Y., 1977). A titre d'indication, les souches CNCM I-1923, I-1924, I-1925 et I-1926 produisent ce polysaccharide.

Cet exopolysaccharide, sous forme native ou hydrolysée, pourrait ainsi satisfaire avantageusement une diète infantile complète.

Pour cela, on peut préparer une diète pour des enfants et/ou des nourrissons comprenant un lait qui a été acidifié avec au moins une souche de bactérie lactique productrice d'un EPS constitué par un enchaînement de glucose, galactose et N-

acétylglucosamine dans une proportion de 3:2:1, respectivement, notamment avec les souches CNCM I-1924, I-1925 ou I-1926, par exemple.

On peut aussi préalablement isoler cet EPS d'un milieu de culture de ce biotype, et 5 l'utiliser, sous forme native ou hydrolysée, comme ingrédient dans une diète infantile, par exemple.

L'isolation de l'EPS consiste généralement à retirer les protéines et les bactéries du 10 milieu de culture et à isoler une fraction purifiée de l'EPS. On peut opérer l'extraction des protéines et des bactéries par précipitation avec un alcool ou l'acide trichloroacétique suivie d'une centrifugation, tandis que l'on peut purifier l'EPS par précipitation dans un solvant comme l'acétone suivie d'une centrifugation, par exemple. Si nécessaire, l'EPS peut être encore purifié au moyen 15 d'une chromatographie par gel-filtration ou par affinité, par exemple.

15 Dans le contexte de la présente invention, l'isolation d'un EPS couvre également toutes les méthodes de production d'un EPS par fermentation suivie d'une concentration du milieu de culture par séchage ou ultrafiltration, par exemple. La 20 concentration peut être opérée par toutes les méthodes connues de l'homme du métier, et en particulier par les méthodes de lyophilisation ou de pulvérisation sous un flux d'air chaud, par exemple. A cet effet, les méthodes décrites dans US3985901, EP298605 et EP63438 sont incorporées par référence dans la 25 description de la présente invention.

25 Dans la mesure où les oligosaccharides maternels sont de petites tailles, il peut être avantageux de préalablement réaliser une hydrolyse partielle de l'EPS selon 30 l'invention. De préférence, les conditions d'hydrolyse sont choisies de sorte à obtenir des oligosaccharides ayant 3 à 10 unités de sucre, soit donc des oligosaccharides ayant un poids moléculaire de l'ordre de 600 à 2000 Dalton, par exemple.

Plus particulièrement, on peut hydrolyser l'EPS selon l'invention dans une solution de trifluor acétique 0.5N (TFA) pendant 30-90 min et à 100°C, puis évaporer le TFA et récupérer les oligosaccharides.

Un produit infantil préféré comprend du matériel protéique hydrolysé de petit lait, à partir duquel des allergènes choisis dans un groupe d'allergènes consistant en l' α -lactalbumine, la β -lactoglobuline, la sérumalbumine et les immunoglobulines n'ont pas été éliminés et dans lequel le matériel protéique hydrolysé, y compris les allergènes hydrolysés, se présente sous forme de résidus d'hydrolyse ayant un poids moléculaire non supérieur à environ 10 000 Dalton, de sorte que le matériel hydrolysé est sensiblement exempt de protéines allergènes et d'allergènes d'origine protéique (= produit hypoallergénique conforme à la directive Européenne 96/4/EC; Fritsche *et al.*, Int. Arch. Aller and Appl. Imm., 93, 289-293, 1990).

10

On peut mélanger l'EPS selon l'invention, sous forme native ou partiellement hydrolysée, à ce matériel protéique hydrolysé de petit lait, et alors incorporer cette mixture, sous forme sèche ou non, dans de nombreuses préparations alimentaires à usage diététique, en particulier dans des aliments pour nourrissons ou dans des aliments facilement absorbables destinés en priorité aux personnes souffrant d'allergies, par exemple.

20

La présente invention est décrite plus en détail par les exemples présentés ci-après, qui sont précédés par une brève description des figures. Il va de soi, toutefois, que ces exemples sont donnés à titre d'illustration de l'objet de l'invention dont ils ne constituent en aucune manière une limitation. Les pourcentages sont donnés en poids sauf indication contraire.

25

- La figure 1 représente une photographie des profils de migration des protéines totales de plusieurs souches de la nouvelle espèce, sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE, au regard de ceux obtenus avec des souches de *Streptococcus thermophilus*. Le degré de filiation des souches est indiqué à l'aide de l'échelle de corrélation de Pearson et au moyen de l'arborescence faisant face aux profils de protéines (les degrés de corrélation de Pearson de 55 à 100 sont représentés).

30

- La figure 2 représente le graditherme de la souche CNCM I-1920.

Exemple 1 Identification d'une nouvelle espèce de *Streptococcus*

Plusieurs souches de bactéries lactiques isolées dans différentes laiteries en Suisse ont fait l'objet d'une identification génétique et physiologique comme suit. Les méthodes mises en œuvres ainsi que les résultats obtenus, présentés ci-après, montrent que ces souches font partie d'un nouveau groupe de *Streptococcus*, qui est suffisamment distinct et homogène pour qu'on puisse le désigner comme regroupant une nouvelle espèce de bactérie lactique. A titre d'exemple, certaines souches appartenant à cette nouvelle espèce ont été déposées sous le traité de Budapest à la Collection Nationale de Culture de Microorganismes (CNCM), 25 rue due docteur Roux, 75724 Paris, le 14 octobre 1997, où elles ont reçu les numéros d'identification CNCM I-1920, I-1921, I-1922, I-1923, I-1924, I-1925 et I-1926.

1. Morphologie des souches isolées: on observe sous microscope une morphologie caractéristique des *Lactococcus lactis*, c'est à dire une forme de coques assemblées en chaînes.

2. Profil de fermentation des sucres des souches isolées: les sucres fermentescibles par les souches isolées sont généralement le D-galactose, le D-glucose, le D-fructose, le D-mannose, la N-acetyl-(D)glucosamine, la salicine, le cellobiose, le maltose, le lactose, le saccharose et le raffinose. Ce profil de fermentation est proche de celui obtenu avec l'espèce *Lactococcus lactis*.

3. ARN ribosomique 16S des souches isolées

On cultive les souches isolées dans 40 ml de milieu HJL à 37°C pendant 24 h, on récolte les bactéries par centrifugation, on remet en suspension chaque culot bactérien dans 2,5 ml de tampon TE (10 mM Tris pH8, 0,1 mM EDTA) contenant 10 mg/ml de lysozyme, et on incube le tout à 37°C pendant 1 h. On ajoute ensuite 100 µl d'une solution contenant 10 mg/ml de protéinase K, 250 µl d'une solution contenant 500 mM EDTA pH8.0, et 500 µl d'une solution contenant 10% de SDS. On incube le tout à 60°C pendant 1h de sorte à assurer une lyse complète des bactéries. Après avoir refroidit les mélanges, on leur ajoute 2,5 ml de phénol/chloroforme, on les centrifuge pendant 10 min dans une centrifugeuse Heraeus de sorte à séparer 2 phases, et on élimine la phase supérieure. On

5 précipite l'ADN chromosomique présents dans la phase inférieure par addition de 2,5 ml d'une solution contenant 96% d'éthanol, et on agite doucement jusqu'à la formation d'un précipité. On retire l'ADN précipité à l'aide d'un cure-dent en bois, on les dépose dans un tube Eppendorf de 2 ml contenant 1 ml d'un tampon Tris 10 (10 mM de Tris HCl pH 8,0, 10 mM d'EDTA et 10 µg/ml de RNase A), et on incube à 56°C pendant 1h. Après refroidissement, on extrait les différentes suspensions d'ADN avec 1 ml de phénol/chloroforme comme décrit ci-dessus, et on précipite les ADN chromosomiques avec de l'éthanol. Les ADN sont remis en suspension dans un tube Eppendorf contenant une quantité de tampon TE telle que la quantité finale d'ADN pour chaque souche isolée est de l'ordre de 250 µg/ml.

15 On amplifie par PCR un aliquot de 1 µl d'ADN de chaque souche isolée avec les amores ayant les séquences nucléotidiques respectives SEQ ID NO:2 et SEQ ID NO:3 (voir la liste de séquence ci-après), pendant 30 cycles (95°C/30 sec, 40°C/30 sec et 72°C/2 min) en ayant recours à la polymerase *Pwo* de Boehringer. On purifie les produits de PCR à l'aide du kit QIAGEN QIAquick, et on élue les produits dans 50 µl de tampon TE. On digère un échantillon de 20 µl de chaque produit avec les enzymes de restriction *Bam*HI et *Sal*I, on sépare les fragments de 1,6 kb sur un gel d'agarose (1%), on les purifie à l'aide du kit QIAGEN QIAquick, 20 on les clone ensuite dans le vecteur *E. coli* pK19 (Pridmore R.D., Gene 56, 309-312, 1987) digéré préalablement par *Bam*HI and *Sal*I et déphosphorylé; et on transforme les cellules compétentes *E. coli* strain BZ234 (collection de l'université de Bâle, Suisse) avec chaque produit de ligation. On sélectionne les transformants à 37°C sur milieu LB comprenant 50 µg/ml de kanamycine 30 ng/ml de X-gal et 25 10ng/ml d'IPTG. On cultive les colonies blanches contenant l'insert pendant 10 h sur milieu LB- comprenant 50 µg/ml de kanamycine, et on isole les ADN plasmidiques à l'aide du kit QIAGEN QIAprep8.

30 On mélange 4 µl d'échantillon de chaque plasmide (1 pmol/µl: provenant de chaque souche isolée) avec 4 µl d'amorces marquées IRD-41 (amorces de séquençage: MWG Biotech) et 17 µl d'H₂O. Pour chaque souche isolée, on dispense 4 aliquots de 6 µl dans 4 puits de 200 µl, et on leur ajoute 2 µl d'un mix de réaction (Amersham; RPN2536). On amplifie les mélanges par PCR dans le système Hybaid Omn-E par 1 cycle de 95°C pendant 2 min suivi par 25 cycles de 35 95°C/30 sec, 50°C/30 sec et 72°C/1 min. On sépare ensuite classiquement les produits de réaction sur gel de polyacrylamide, et on lit la séquence d'ADN pour

chaque souche isolée. Les fragments d'ADN ainsi séquencés représentent la partie génomique de l'ARN ribosomique 16S.

Les résultats montrent que toutes les souches isolées contiennent une séquence nucléotidique similaire, voire identique à la séquence SEQ ID NO:1 qui est exposée dans la liste de séquence ci-après. Ces séquences présentent de nombreuses homologies avec les séquences d'ARN 16S trouvées dans les espèces de bactéries lactiques appartenant au genre *Streptococcus*, ce qui conduit à classer ces souches parmi le genre *Streptococcus*.

10

4. Identification par gel d'électrophorèse SDS-PAGE

15

Les essais ont été menés conformément aux instructions fournies par Pot *et al.* présentées au cours d'un "workshop" organisé par l'Union Européenne, à l'université de Ghent, en Belgique, le 12 au 16 septembre 1994 (Fingerprinting techniques for classification and identification of bacteria, SDS-PAGE of whole cell protein).

20

En résumé, pour cultiver les bactéries lactiques, on ensemence 10 ml de milieu MRS (de Man, Rogosa et Sharpe) avec une préculture MRS de chaque souche de la nouvelle espèce de bactérie lactique, ainsi que de chaque souche de référence couvrant le plus d'espèces possible de *Streptococcus*. On incube les milieux pendant 24h à 28°C, on les étale sur boîte de Petri comprenant un milieu frais MRS agar, et on incube les boîtes pendant 24h à 28°C.

25

30

35

Pour préparer l'extrait renfermant les protéines des bactéries, on recouvre le milieu MRS agar d'un tampon pH 7,3 renfermant 0,008M de Na₂HPO₄.12H₂O, 0,002M de Na₂HPO₄.2H₂O et 8% de NaCl. On récupère les bactéries en grattant la surface du milieu gélifié, on filtre la suspension au travers d'une gaze Nylon, on la centrifuge 10 min à 9000rpm avec un rotor GSA, on récupère le culot que l'on reprend dans 1 ml de tampon précédent. On lave le culot en répétant la procédure de centrifugation-lavage, on récupère finalement environ 50mg de cellules auxquelles on ajoute un volume de tampon STB pH 6,8 (pour 1000 ml: 0,75 g Tris, 5ml C₂H₆OS, 5g de glycérol), on casse les cellules par des ultrasons (Labsonic 2000), on centrifuge les débris cellulaires, et on conserve le surnageant renfermant les protéines totales.

On prépare ensuite classiquement un gel de polyacrylamide SDS-PAGE de 1,5 mm d'épaisseur (Biorad-Protean ou Hoefer SE600) réticulé avec 12% d'acrylamide dans le cas du gel de séparation (12,6 cm de hauteur) et 5% d'acrylamide dans le cas du gel de concentration (1,4 cm de hauteur). Pour cela, on réalise notamment la polymérisation des deux parties de gel dans un bain thermostaté à 19°C pendant 24h et 1h respectivement, de sorte à réduire au maximum les imperfections du gel et à maximiser la reproductibilité des essais.

On sépare alors les protéines de chaque extrait sur le gel d'électrophorèse SDS-PAGE. Pour cela, on applique 6 mA pour chaque plaque contenant 20 pistes jusqu'à ce que le colorant atteigne 9,5 cm de distance depuis le haut du gel de séparation. On fixe ensuite les protéines dans le gel, on les colore, on sèche le gel sur un cellophane, on numérise le gel au moyen d'un densimètre (LKB Ultroscan Laser Densimètre, Suède) relié à un calculateur, et on compare les profils entre eux au moyen du logiciel GelCompar®, version 4.0, Applied Maths, Kortrijk, Belgique. Dans la mesure où les essais étaient suffisamment bien standardisés, les profils des différentes espèces de *Streptococcus* contenus dans une banque de données ont aussi été utilisés au cours de la comparaison numérique.

Les résultats montrent alors que toutes les souches testées appartenant à la nouvelle espèce se distinguent de toutes les espèces suivantes: *S. acidominimus*, *S. adjacens*, *S. agalactiae*, *S. alactolyticus*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. caprinus*, *S. casseliflavus*, *S. cecorum*, *S. constellatus*, *S. cremoris*, *S. cricetus*, *S. cristatus*, *S. defectivus*, *S. difficile*, *S. downei*, *S. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *S. equi*, *S. equi* ssp. *equi*, *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, *S. equinus*, *S. faecalis*, *S. faecium*, *S. ferus*, *S. gallinarum*, *S. gallolyticus*, *S. garvieae*, *S. gordonii*, *S. hansenii*, *S. hyointestinalis*, *S. hyovaginalis*, *S. iniae*, *S. intermedius*, *S. intestinalis*, *S. lactis*, *S. lactis* *cremoris*, *S. lactis* *diacetilactis*, *S. macacae*, *S. mitis*, *S. morbillorum*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. parauberis*, *S. parvulus*, *S. phocae*, *S. plantarum*, *S. pleomorphus*, *S. pneumoniae*, *S. porcinus*, *S. pyogenes*, *S. raffinolactis*, *S. ratti*, *S. saccharolyticus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. shiloi*, *S. sobrinus*, *S. suis*, *S. thermophilus*, *S. thoraltensis*, *S. uberis*, *S. vestibularis* et *S. viridans*.

L'ensemble des résultats montrent que degré de corrélation de Pearson entre les souches déposées est d'au moins 85. A titre d'indication, la figure 1 représente une

photographie d'un des gels d'électrophorèse, la filiation sous forme d'une arborescence, ainsi que le degré de corrélation de Pearson (indiqué dans l'échelle supérieure gauche). Les souches LAB 1550, LAB 1551 et LAB 1553 font spécifiquement références aux souches CNCM I-1921, I-1922 et I-1925. Les 5 souches LMG15061 et LAB 1607 n'ont pas été déposées auprès de la CNCM, mais font manifestement parties de cette nouvelle espèce.

En définitive, toutes les souches isolées font clairement parties d'un groupe homogène, qui est distinct des autres espèces appartenant au genre *Streptococcus*.

10

Exemple 2 Biotype mésophile/thermophile

Certaines souches isolées à l'exemple 1 représentent un nouveau biotype particulier dans la mesure où elles présentent la propriété remarquable d'être à la 15 fois mésophile et thermophile.

Cette propriété est facilement observée (1) en préparant, en parallèle, plusieurs cultures d'un biotype mésophile/thermophile dans un milieu M17-lactose à des températures s'échelonnant de 20 à 50°C, (2) en mesurant les absorbances des milieux à 540 nm après 16h de culture, et (3) en réunissant les résultats sous forme 20 d'un graphique, représentant l'absorbance en fonction de la température (graditherme).

La figure 1 représente le graditherme obtenu avec la souche CNCM I-1920. 25 Toutes les autres souches isolées appartenant à ce biotype particulier, notamment les souches CNCM I-1921 et I-1922, donnent également des gradithermes comparables.

30

Exemple 3 Biotype texturant

Plusieurs souches isolées à l'exemple 1 présentent la propriété remarquable d'être extrêmement texturantes. Cette propriété peut être observée à l'aide du paramètre rhéologique de viscosité mesuré avec le rhéomètre rotatif Bohlin VOR (Bohlin GmbH, Allemagne).

35

Pour cela, on cultive certaines des souches isolées dans un lait semi-écrémé à 38°C jusqu'à un pH de 5,2. Conformément aux instructions du fournisseur, un échantillon de chaque milieu de culture est ensuite placé entre un plateau et un cône tronqué de même diamètre (30 mm, angle de 5,4°, entrefer de 0,1 mm), puis l'échantillon est soumis à un gradient de vitesse de cisaillement rotatif continu qui le force à s'écouler. On détermine alors la viscosité de l'échantillon à la vitesse de cisaillement de 293 s⁻¹. Les résultats des tests de rhéologie effectués avec certaines des souches isolées montrent que les milieux de culture ainsi fermentés présentent une viscosité supérieure à 100 mPa.s, voir une viscosité dépassant 200 mPa.s dans le cas des souches CNCM I-1922, I-1923, I-1924, I-1925 et I-1926.

Pour comparaison, on obtient, dans les mêmes conditions opératoires, des viscosités de l'ordre de 54, 94, 104, 158 et 165 mPa.s avec respectivement les souches *Lactobacillus helveticus* CNCM I-1449, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1351, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1879, *Streptococcus thermophilus* CNCM I-1590, *Lactobacillus bulgaricus* CNCM I-800 et *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* CNCM I-1692, dont il est fait mention respectivement dans les demandes de brevet EP699689, EP638642, EP97111379.0, EP750043, EP367918 et EP97201628.1 (Les souches CNCM I-800 et I-1692 sont réputées être des souches très texturantes).

Exemple 4 Nouvel exopolysaccharide

Certaines souches isolées à l'exemple 1, appartenant au biotype texturant, notamment les souches CNCM I-1923, I-1924, I-1925 et I-1926, produisent un EPS de haut poids moléculaire dont la composition en sucre est similaire à celles retrouvées dans certains oligosaccharides du lait maternel humain. L'analyse des sucres composant ce polysaccharide est effectuée de la manière suivante.

On cultive les souches de la nouvelle espèce dans un lait écrémé reconstitué à 10%, sous agitation, pendant 24 h à 30°C, le pH étant maintenu à 5,5 par addition d'une solution de NaOH 2N. On élimine les cellules bactériennes et les protéines du milieu de culture au moyen d'une précipitation dans un volume égal d'une solution de 25% en poids d'acide trichloroacétique, suivie d'une centrifugation (10000g, 1h). On précipite les EPS par addition d'un volume équivalent d'acétone, suivie d'une décantation pendant 20h à 4°C. On récupère les EPS par

centrifugation, on reprend le culot dans une solution 0,1 M NH₄HCO₃ pH7, et on dialyse la suspension contre de l'eau pendant 24 h. On élimine alors les matériaux insolubles par ultracentrifugation, et on lyophilise le rétentat contenant l'EPS purifié. La quantité d'EPS purifié, exprimé en mg d'équivalent glucose, est de 5 l'ordre de 40 mg par litre de culture.

On détermine le poids moléculaire de l'EPS au moyen d'une chromatographie par gel-filtration à l'aide d'une colonne Superose-6 connectée à un système FPLC (Pharmacia), comme décrit par Stingele *et al.*, J. bacteriol., 178, 1680-1690, 1996. 10 Les résultats montrent que toutes les souches CNCM I-1923, I-1924, I-1925 et I-1926 produisent un EPS d'une taille supérieure à 2 x 10⁶ Da.

15 100 mg d'équivalent glucose de l'EPS purifié sont hydrolysés dans du TFA 4N à 125°C pendant 1 h, avant d'être dérivatisés et analysés par chromatographie GLC selon la méthode décrite par Neeser *et al.* (Anal. Biochem., 142, 58-67, 1984). Les résultats montrent que les souches produisent un EPS constitué de glucose, galactose et N-acétylglucosamine dans une proportion moyenne 3:2:1, respectivement.

20 **Exemple 5** Produit infantile

On prépare un petit-lait hydrolysé à 18% par la trypsine en suivant les recommandations de US5039532, on le séche traditionnellement par pulvérisation sous un flux d'air chaud, et on lui incorpore entre 0,1 et 10% de l'EPS purifié sec 25 décrit à l'exemple 4. Ce produit peut être rapidement reconstitué dans de l'eau. Il convient particulièrement à une diète pour enfants ou nourrissons du fait de ses propriétés hypoallergénique et tolérante au lait de vache, et qu'il est complet d'un point de vue de la composition glucidique.

30 **Exemple 6** Produit infantile

On hydrolyse l'EPS purifié sec de l'exemple 4 dans une solution de trifluoracétique 0,5N (TFA) pendant 30-90 min et à 100°C, on évapore le TFA, on met en suspension l'hydrolysat dans de l'eau et on sépare les oligosaccharides ayant 3 à 10 35 unités de sucre (600 à 2000 Dalton) par ultrafiltration.

On prépare un petit-lait hydrolysé à 18% par la trypsine en suivant les recommandations de US5039532, on le séche traditionnellement par pulvérisation sous un flux d'air chaud, et on lui incorpore entre 0,1 et 10% des oligosaccharides purifiés décrits ci-dessus. Ce produit peut être rapidement reconstitué dans de l'eau. Il convient particulièrement à une diète pour enfants ou nourrissons du fait de ses propriétés hypoallergénique et tolérogène au lait de vache, et qu'il est complet d'un point de vue de la composition glucidique.

Exemple 7 Produit pharmaceutique

10

On prépare une composition pharmaceutique sous forme d'une capsule fabriquée à base de gélatine et d'eau, et qui contient 5 à 50 mg de l'EPS purifié de l'exemple 4 ou des oligosaccharides purifiés de l'exemple 6.

Exemple 8 Produit pharmaceutique

15

On prépare des pastilles constituées par une culture de la souche CNCM I-1924 lyophilisée, puis compressée avec un agent liant adéquat. Ces pastilles sont particulièrement indiquées pour restaurer une flore intestinale en bactéries lactiques et pour satisfaire une diète équilibrée en glucides complexes essentiels.

20

Revendications

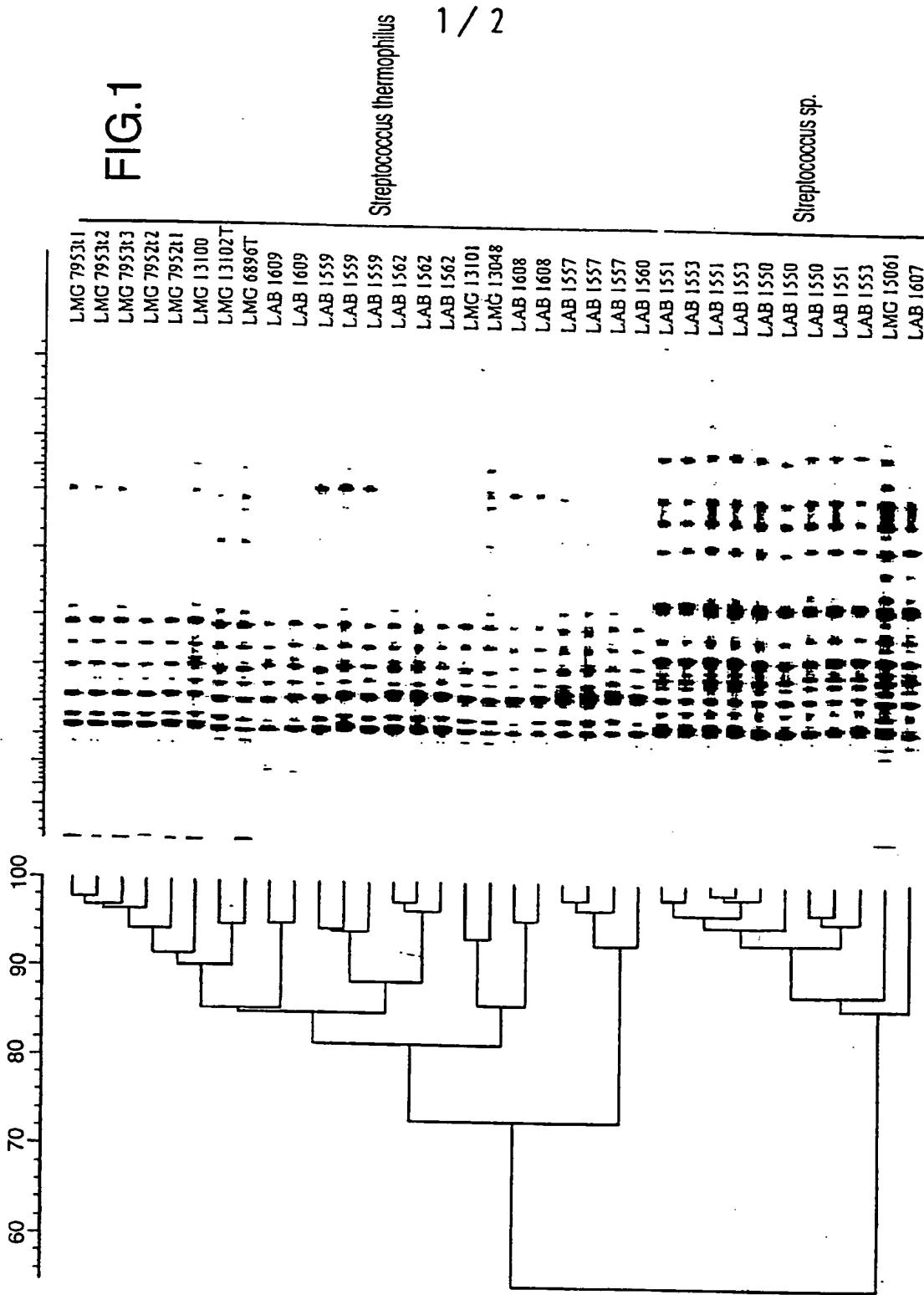
1. Souche de bactérie lactique,
 - dont l'ARN ribosomique 16S est caractéristique du genre *Streptococcus*,
 - dont le profil en protéines totales, obtenu après migration des protéines totales sur gel d'électrophorèse SDS-PAGE, est caractéristique de celui de la souche de bactérie lactique CNCM I-1920, mais distinct de ceux des espèces reconnues appartenant au genre *Streptococcus*, à savoir *S. acidominimus*, *S. agalactiae*, *S. alactolyticus*, *S. anginosus*, *S. bovis*, *S. canis*, *S. caprinus*, *S. constellatus*, *S. cricetus*, *S. cristatus*, *S. difficile*, *S. downei*, *S. dysgalactiae* ssp. *dysgalactiae*, *S. dysgalactiae* ssp. *equisimilis*, *S. equi*, *S. equi* ssp. *equi*, *S. equi* ssp. *zooepidemicus*, *S. equinus*, *S. ferus*, *S. gallolyticus*, *S. gordonii*, *S. hyointestinalis*, *S. hyovaginalis*, *S. iniae*, *S. intermedius*, *S. intestinalis*, *S. macacae*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*, *S. parauberis*, *S. phocae*, *S. pieomorphus*, *S. pneumoniae*, *S. porcinus*, *S. pyogenes*, *S. ratti*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. shiloi*, *S. sobrinus*, *S. suis*, *S. thermophilus*, *S. thoraltensis*, *S. uberis*, *S. vestibularis*, *S. viridans*.
2. Souche de bactérie lactique selon la revendication 1, dont le profil en protéines totales, obtenu après culture de la bactérie dans un milieu MRS pendant 24 h à 28°C, extraction des protéines totales et migration des protéines sur un gel d'électrophorèse SDS-PAGE, présente un degré de corrélation de Pearson d'au moins 78 au regard du profil obtenu dans des conditions identiques avec la souche de bactérie lactique CNCM I-1920.
3. Souche de bactérie lactique selon la revendication 1, capable de fermenter le D-galactose, le D-glucose, le D-fructose, le D-mannose, la N-acétyl-(D)-glucosamine, la salicine, la cellobiose, le maltose, le lactose, le saccharose et le raffinose.
4. Souche de bactérie lactique selon la revendication 1 choisie parmi les souches CNCM I-1920, I-1921, I-1922, I-1923, I-1924, I-1925, I-1926.
5. Souche de bactérie lactique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle présente un optimum de croissance dès environ 28°C jusqu'à environ 45°C.

6. Souche de bactérie lactique selon la revendication 1, qui, lorsqu'elle fermente un lait semi-écrémé à 38°C jusqu'à pH 5,2, donne une viscosité au milieu qui est supérieure à 100 mPa.s à une vitesse de cisaillement de l'ordre de 293 s⁻¹.
- 5 7. Souche de bactérie lactique selon la revendication 1, caractérisée en ce qu'elle produit un exopolysaccharide constitué par un enchaînement de glucose, galactose et N-acétylglucosamine dans une proportion de 3:2:1 respectivement.
- 10 8. Utilisation d'une souche de bactérie lactique selon l'une des revendications 1 à 7 pour la préparation d'une composition alimentaire, notamment d'un lait acidifié.
- 15 9. Utilisation d'un polysaccharide, susceptible d'être sécrété par une souche de bactérie lactique selon le revendication 7, pour la préparation d'une composition alimentaire.
- 20 10. Utilisation selon le revendication 9, pour la préparation d'une composition destinée à satisfaire une diète infantile complète.
- 25 11. Composition alimentaire ou pharmaceutique comprenant une souche de bactérie lactique selon l'une des revendications 1 à 7.
12. Composition alimentaire ou pharmaceutique comprenant un polysaccharide, susceptible d'être sécrété par la souche CNCM-1924, constitué par un enchaînement de glucose, galactose et N-acétylglucosamine dans une proportion respective de 3:2:1.
- 30 13. Composition selon la revendication 12, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition infantile.
- 35 14. Composition selon la revendication 13, caractérisée en ce qu'il s'agit d'une composition infantile hypoallergénique.
15. Composition selon l'une des revendications 12-4, caractérisée en ce que le polysaccharide est sous forme hydrolysée, constitué en majorité de 3 à 10 unités de sucre.

16. Polysaccharide, susceptible d'être sécrété par la souche CNCM I-1924, constitué par un enchaînement de glucose, galactose et N-acétylglucosamine dans une proportion respective de 3:2:1.

1 / 2

1
FIG.



2 / 2

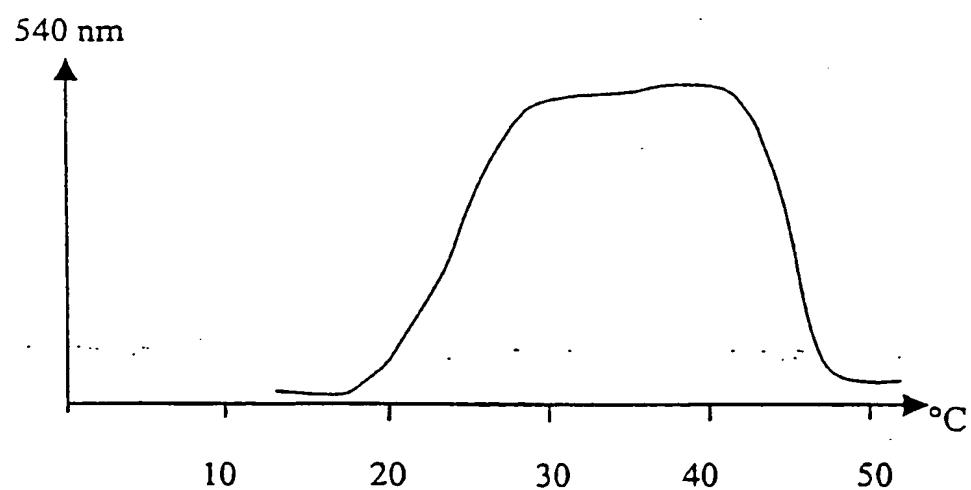


FIG.2

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATIONS GENERALES:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: SOCIETE DES PRODUITS NESTLE
- (B) RUE: AV NESTLE 55
- (C) VILLE: VEVEY
- (D) ETAT OU PROVINCE: VAUD
- (E) PAYS: SUISSE
- (F) CODE POSTAL: 1500

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouvelle espece de bacterie lactique

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 3

(iv) FORME DECHIFFRABLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (OEB)

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 1522 paires de bases
- (B) TYPE: nucl.otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

30	GTCGACAGAG	TTCGATCCTG	GCTCAGGACG	AACGCTGGCG	CCGTGCCTAA	TACATGCAAG	60
	TAGAACGCTG	AAGACTTTAG	CTTGCTAGAG	TTGGAAGAGT	TGCGAACGGG	TGAGTAACGC	120
35	GTAGGTAACC	TGCCATTAG	TGGGGGATAA	CTATTGGAAA	CGATAGCTAA	TACCGCATAA	180
	TAGTGTAA	CACATGTTAG	AGACTTAAAA	GATGCAATTG	CATCACTAGT	AGATGGACCT	240
40	GCGTTGTATT	AGCTAGTTGG	TGGGTAACG	GCCTACCAAG	GCGACGATAC	ATAGCCGACC	300
	TGAGAGGGTG	ATCGGCCACA	CTGGGACTGA	GACACGGCCC	AGACTCCTAC	GGGAGGCAGC	360
45	AGTAGGGAAT	CTTCGCAAT	GGGGGCAACC	TGACCGAGCA	ACGCCGCGTG	AGTGAAGAAG	420
	TTTTCCGGAT	CGTAAAGCTC	TGTTGTAAGA	GAAGAACGTG	TGTGAGAGTG	GAAAGTTCAC	480
50	ACAGTGACGG	TAACCTACCA	GAAAGGGACG	GCTAACTACG	TGCCAGCGAGC	CGCGGTAATA	540
	CGTAGGTCCC	GAGCGTTGTC	CGGATTTATT	GGCGTAAAG	CGACGCCAGG	CGGTTTAATA	600
55	AGTCTGAAGT	TAAAGGCAGT	GGCTTAACCA	TTGTTCGCTT	TGGAAACTGT	TAAACTTGAG	660
	TGCAGAAGGG	GAGAGTGGAA	TTCCATGTGT	AGCGGTGAAA	TGCGTAGATA	TATGGAGGAA	720
	CACCGGTGGC	GAAAGCGGCT	CTCTGGTCTG	TAACTGACGC	TGAGGCTCGA	AAGCGTGGGG	780
	AGCAAACAGG	ATTAGATACC	CTGGTAGTCC	ACGCCGTAAA	CGATGAGTGC	TAGGTGTTAG	840
	GCCCTTTCCC	GGGCTTAGTG	CCGCAGCTAA	CGCATTAAAGC	ACTCCGCCTG	GGGAGTACGA	900
	CCGCAAGGGT	GAAACTCAAA	GGAATTGAGC	GGGGCCGCAC	AAGCGGTGGA	GCATGTGGTT	960
	TAATTCAAG	CAACCGAAG	AACTTACCAAG	GTCTTGACAT	CCCCATGCTA	TTTCTAGAGA	1020
	TAGAAAGTTT	CTTCGGAACA	TCGGTGACAG	GTGGTGATG	GTGTCGTC	GCTCGTGTG	1080
	TGAGATGTTG	GGTTAAGTCC	CGCAACGAGC	GCAACCCCTA	TTGTTAGTTG	CCATCATTCA	1140
	GTTGGGCACT	CTAGCGAGAC	TGCCGGTGAT	AAACCGGAGG	AAGGTGGGA	TGACGTCAA	1200
	TCATCATGCC	CCTTATGACC	TGGGCTACAC	ACGTGCTACA	ATGGTTGGTA	CAACGAGTCG	1260
	CAAGCCGGTG	ACGGCAAGCA	AATCTCTTAA	AGCCAATCTC	AGTTCGGATT	GTAGGCTGCA	1320
	ACTCGCCTAC	ATGAAGTCGG	AATCGCTAGT	AAATCGCGGAT	CAGCACGCGG	CGGTGAATAC	1380
	GTTCCCCGGGC	CTTGTACACA	CCGCCCGTCA	CACCACGAGA	GTTTGTAAACA	CCCGAAGTCG	1440
	GTGAGGTAAC	CTTTTAGGAN	CCAGCCGCCT	AAGGTGGGAC	AGATGATTGG	GGTGAAGTCG	1500
	TAACAAGGTA	ACCGTAGGAT	CC				1522

2/2

(2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 34 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "amorce"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

10

ATATCCGTTT TTTCGACAGA GTTYGATYCT GGCT

34

15 (2) INFORMATIONS POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: nucl,otide
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: lin,aire

20 (ii) TYPE DE MOLECULE: Autre acide nucléique

- (A) DESCRIPTION: /desc = "amorce"

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

25

ATATCCGGAT CCTACGGYTA CCTTGTTACG ACT

33